

報告書

平成17年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

樹状細胞を用いたTヘルパーI型, II型免疫応答制御療法の為の
基礎的研究

受賞者 植村 靖史(埼玉医科大学免疫学教室)

共同研究者 劉 天懿¹⁾, 鈴木 元晴²⁾, 成田 弥生³⁾高木 理恵¹⁾, 大山 秀樹¹⁾, 涌井 昌俊¹⁾菊地 博達³⁾, 石原 理²⁾, 松下 祥¹⁾

緒言

近年, 全身性強皮症 (J. Exp. Med. 182:1163-8. 1995.), 1型糖尿病 (Nature 391:177-81. 1998.), SLE (Lupus 7:565-8. 1998.), 関節リウマチ (Arthritis Rheum. 44:1127-38. 2001.)などの自己免疫疾患の患者群において, NKT細胞の減少あるいは機能不全が報告され, これらの疾患の病因, 病態に深く関与していることが示唆されている.

NKT細胞は, その活性化を通してTh2応答を促進し, 臓器特異的自己免疫疾患の防止に寄与するとの報告があるが (J. Exp. Med. 194: 1801-11. 2001. Nat. Med. 7: 1052-56. 2004.), その一方で樹状細胞 (DC) のIL-12産生を誘導することにより1型ヘルパーT (Th1) 応答を促進し, 腫瘍拒絶あるいは感染防御にも貢献するという報告もある (J. Exp. Med. 9: 1503-17. 2005.). これらの矛盾する観察は, 機能的に異なるNKTサブセットが存在し, それぞれが異なる免疫応答を誘導することを示唆するものである.

実際, ヒトNKT細胞には, $CD4^{+}$, および $CD4^{-}CD8\beta^{-}$ (double negative: DN) の2つの主要なサブセットが存在するが, これらのサイトカイン産生性やケモカイン受容体の発現パターンの違いだけでは以上の現象を説明するに至っていない. 最近, このNKT細胞が免疫制御の中心的役割を果たしている樹状細胞 (dendritic cells: DCs) と相互作用することでDCの成熟を誘導し, 免疫応答性を制御することが明らかとなった. しかし, 機能的に異なるこれらのNKTサブセットがDCに付与する機能的修飾, およびこれに関

連する分子機構については明らかにされていない. これらの機序を解明することで, 自己免疫疾患の病因・病態の解明に貢献するとともに, 特定のNKTサブセットを用いて機能的修飾を付与したDC, あるいはサブセットに発現する特有の分子をターゲットとした自己免疫応答制御法の開発に資することができる.

本研究課題では, ヒトNKTサブセットとDCとの相互作用により, 異なるNKTサブセットがDCに付与する機能的修飾をDCの産生する液性因子, Th分化誘導性の観点から明らかにした. また, NKTサブセットとDCとの相互作用によって誘導される免疫寛容誘導活性を, 自己免疫疾患関連Th細胞クローンの応答性 (増殖応答性) を評価することで明らかにし, NKTサブセットとDCの相互作用を応用した自己免疫応答制御の可能性を*in vitro*で評価した.

材料と方法

ヒトV α 24インバリエントNKT細胞株の樹立と精製

健康人ボランティアの同意を得た上で採血を行い, 分離した末梢血単核球 (PBMC) よりCD14陽性単球を磁気分離した. これをIL-4 (100 U/ml), およびGM-CSF (50 ng/ml) 存在下, 5日間培養することでヒト単球由来DCを誘導した. 一方, PBMCよりTCRV α 24陽性細胞を磁気分離し, 抗原として α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) をパルスしたDCを抗原提示細胞 (APC) とし, 7-9日おきに複数回刺激することにより, α -GalCer特異的ヒトV α 24インバリエントNKT細胞株を樹立した. さらに, V α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 β^{-} , およびV α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 β^{-} の各サブセットを, 高速自動セルソーターを用いて精製した.

1) 埼玉医科大学免疫学教室, 2) 埼玉医科大学産婦人科学教室
3) 埼玉医科大学麻酔学教室

NKTサブセットがDCにおけるサイトカイン産生および表面分子の発現に及ぼす影響の評価

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養し、24時間後の上清中のIL-12p70, 48時間後のIL-12p40, およびIL-6をELISA法により定量した。一方、共培養開始24時間後のDCにおけるHLA-DR, CD40, CD80, CD83, およびCD86分子の発現を解析することでDCの成熟状態を評価した(フローサイトメトリー)。

NKTサブセットがDCを介してTh分化に及ぼす影響の評価

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養することでDCの成熟を誘導した。24時間培養後、これらのDCとHLA-DRの異なるアロナイーブTh細胞を共培養することによりMLRを誘導した。MLRにより誘導される増殖応答性は、 ^3H -thymidineの取り込みを測定することで評価した。一方、MLRによって増殖・分化したTh細胞のケモカイン受容体(CCR4, CXCR3), サイトカイン産生性(IFN- γ , IL-4, IL-5, およびIL-13)の発現を評価することでTh分化を決定した(ELISA法, フローサイトメトリー)。

DCのIL-12産生に重要なCD4サブセットの液性因子の決定

α -GalCerをパルスしたDCとNKTサブセットを共培養する際に、NKTサブセットが産生するサイトカイン(IFN- γ , IL-4, 10, 13)に対する中和抗体を用いて、これらに関連するシグナルを阻止した際のIL-12産生を指標に重要な候補の液性因子を決定した。

GAD65自己反応性Thクローンに対するDCの免疫寛容誘導活性の評価

HLA-DR53陽性ドナー由来のDCとNKTサブセットを共培養した。24時間培養後、このDCに65kDaグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65) p111-131ペプチドをパルスし、これと1型糖尿病患者より樹立されたHLA-DR53拘束性GAD65p111-131反応性Th細胞クローンを共培養した(J. Immunol. 170: 947-60, 2003.)。Th細胞クローンにおける増殖応答の抑制は、 ^3H -thymidine取り込みを測定することで評価した。また、Th細胞クローンをCFSEにてラベルしてDCと共培養4日後の分裂抑制の程度をフローサイトメトリーにより解析した。以上の結果からDCを介した自己反応性Th応答制御の有効性を評価した。

結果

NKT細胞株の樹立とNKTサブセットの精製分離

健康人末梢血単核球よりTCRV α 24陽性細胞を α -GalCer刺激することにより、V α 24インバリアントNKT細胞株を樹立した。さらにV α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 β^{-} , およびV α 24 $^{+}$ 6B11 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 β^{-} の各サブセットを、高速自動セルソーターを用いて精製

した。それぞれのNKTサブセットは、TCRV α 24陽性、V β 11陽性(図1)であり、CD1d拘束性に α -GalCerを認識し、増殖応答を示すとともに多量のIFN- γ とIL-4を産生した(data not shown)。

CD4サブセットはDCのIL-6とIL-12産生を誘導する

CD4サブセットと共培養されたDCは、NKT:DC比および α -GalCer濃度依存性にIL-12p40, IL-12p70, およびIL-6を産生した(図2 a-c)。また健康人ドナー(5人)由来のCD4サブセットは、その活性化を通してDCにIL-6およびIL-12産生を誘導した(図2 d, e)。

NKTサブセットはDCの成熟を誘導する

CD4およびDNサブセットは、ともにその活性化を通してDCにおけるHLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86分子の発現上昇を誘導した(図3)。CD4とDNの間には差異は認められなかった。また、サブセットを蛋白合成阻害剤であるemetineで処理した場合には、 α -GalCer存在する場合だけにDCの成熟が誘導された(data not shown)。

NKTサブセットはDCを介して異なるTh分化を誘導する

CD4およびDNサブセットは、ともにその活性化を通してDCの成熟を誘導し、アロMLR誘導活性を上昇させた(図4 a)。CD4サブセットにより成熟したDCは、CCR4/CXCR3比Low, Th1/2サイトカイン比HighのTh1分化を誘導した。一方、DNサブセットにより成熟したDCは、CCR4/CXCR3比High, Th1/2サイトカイン比LowのTh2分化を誘導した(図4 b-d)。これらの効果は、emetineによって処理されたNKTサブセットを用いた場合では消失した。さらにDCと共培養したDN/CD4サブセットの比を人工的に変化させた場合では、DN/CD4比に依存してCCR4/CXCR3比が上昇し、IL-4陽性細胞数/IFN- γ 陽性細胞数の増加が認められた(図5 a, b)。同様の条件でDCにおけるIL-6およびIL-12産生を評価したところ、DN/CD4比が増加するに従って、これらのサイトカイン産生は減少した(図5 e)。サブセット間の細胞傷害性の違いは認められなかった(図5 c, d)。

NKTサブセットはともにCD40Lを発現するがDCの異なるIL-12産生性を誘導する

CD40L分子は活性化T細胞に発現し、DC上のCD40分子をligationすることでDCにおけるIL-12産生を誘導することが知られている。NKTサブセットを図6 aに示す条件で刺激した場合のCD40L分子の発現は、サブセット間で差異を認めなかった。CD4サブセットと α -GalCer-DCの共培養系では、CD40L阻害抗体により、DCにおけるIL-12産生阻害が観察された(図6 b)。一方、抗CD3抗体刺激のDNサブセットとDCの共培養系では、DCにおけるIL-12産生が誘導される為(図6 c)、これにCD40L阻害抗体を加えて評価したところIL-12産生の抑制が認められ、DNサブセッ

トのCD40L分子は機能的に完全であることが明らかとなった(図6d). また, この条件にさらに α -GalCerを加えて評価したところ, CD4サブセットは α -GalCer濃度依存性にDCのIL-12産生を促進し, DNサブセットはこれを抑制した(図6e).

CD4サブセット由来のTh2サイトカインはDCにおけるIL-12産生に相互依存的に作用する

CD4サブセットは, IL-4, IL-13等のTh2サイトカインを大量に産生することが知られている. NKTサブセットの産生するIFN- γ , IL-4, IL-13はDCにおけるIL-12産生を促進し, さらにこれらのNKTサイトカインの相互作用により, さらに促進された(図7a-e). また, CD4サブセット由来のIL-10は抑制的に作用した(図7c).

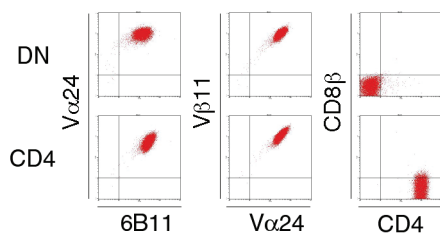


図 1. NKT サブセットの樹立.

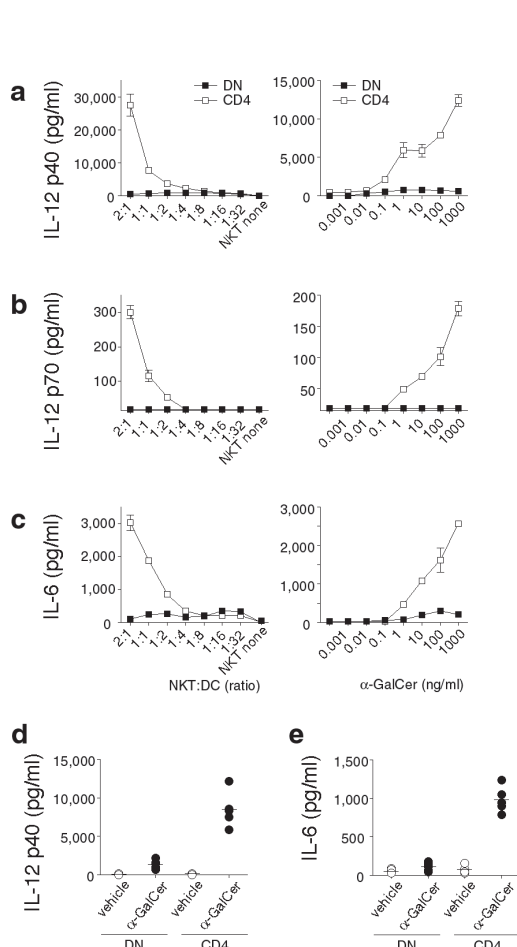


図 2. NKT サブセット-DC 共培養系におけるDCのサイトカイン産生.

以上よりCD4サブセットの産生するTh2サイトカインはDCにおけるIL-12p70産生を促進することが明らかとなった.

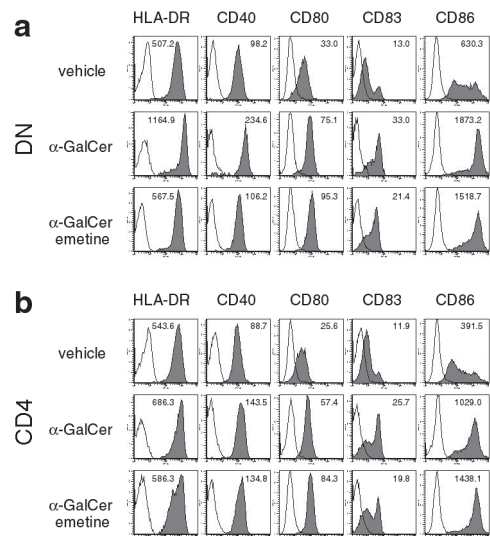


図 3. NKT サブセットと-DC 共培養系におけるDCの成熟状態.

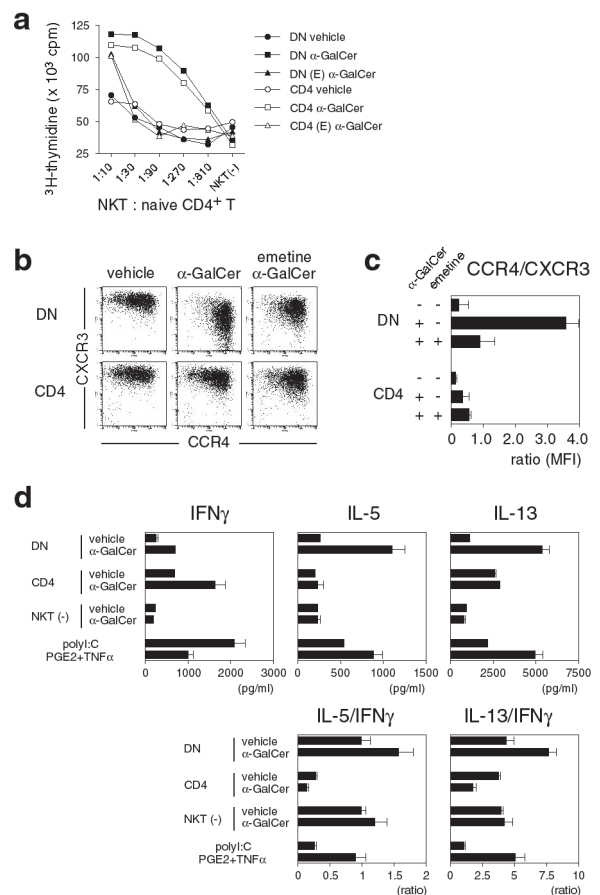


図 4. アロMLR誘導活性とTh分化誘導性. a. アロMLR誘導活性の評価. b-c. 分化Th細胞におけるケモカイン受容体(CXCR3, CCR4)発現. d. 分化Th細胞におけるサイトカイン産生(CD3/28刺激24h).

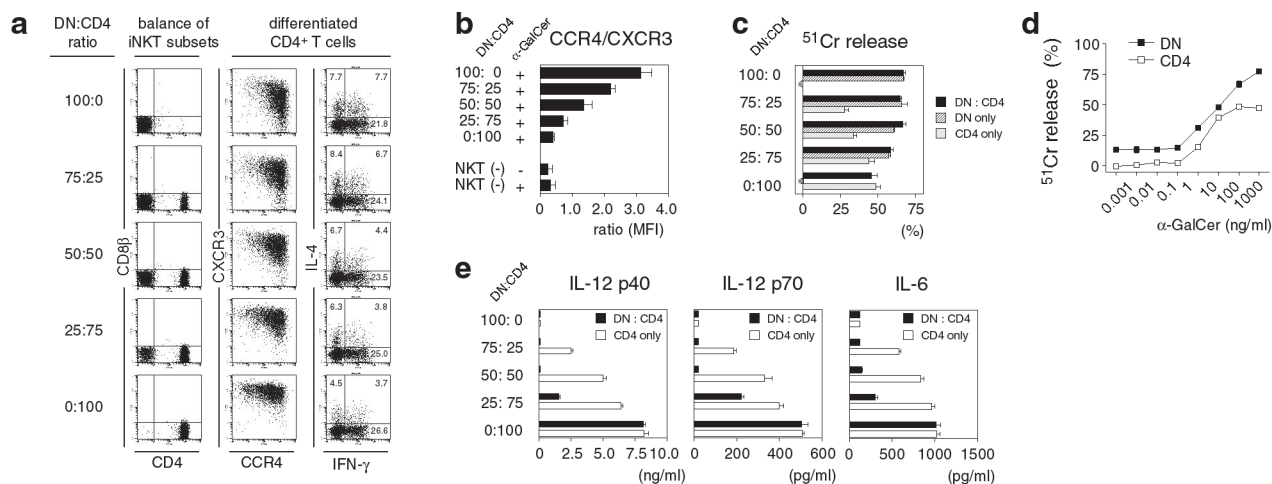


図 5. NKTサブセットのバランスがDCを介してTh分化に及ぼす影響の解析. a-b. NKTサブセットのバランスと分化Th細胞におけるCXCR3, CCR4, 細胞内IL-4, 細胞内IFN- γ . c, d. DCに対する細胞傷害性 (⁵¹Cr release assay). e. DCにおけるIL-12, IL-6産生.

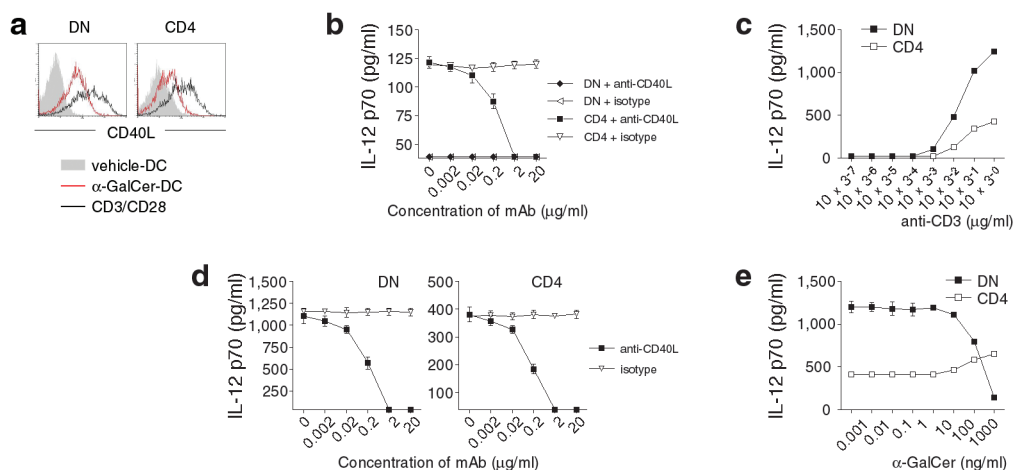


図 6. NKTサブセットのCD40L機能. a. 各サブセットにおけるCD40L分子の発現. b. NKT-DC共培養系にCD40L阻害抗体を添加した際のDCにおけるIL-12p70産生. c. CD3刺激したNKTサブセットとDCを共培養した際のDCにおけるIL-12p70産生. d. c.にCD40L阻害抗体を添加した際のDCにおけるIL-12p70産生. e. c.にα-GalCerを添加した際のDCにおけるIL-12p70産生.

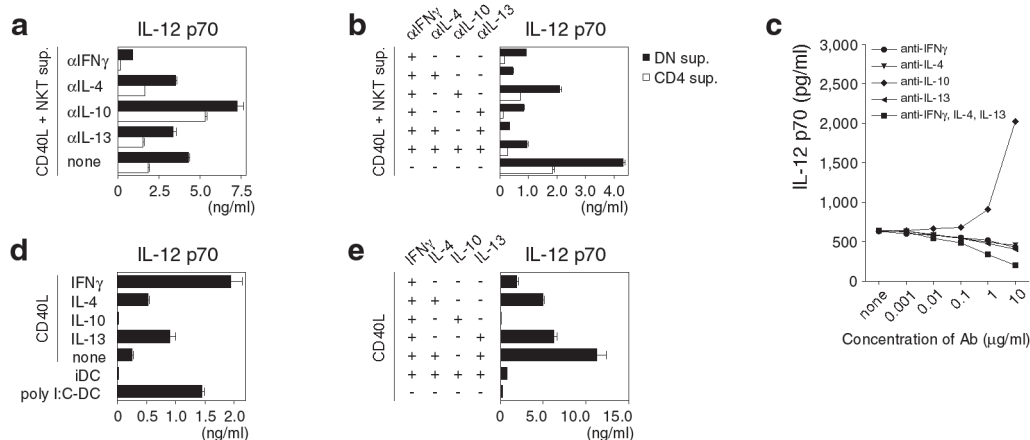


図 7. NKTサブセットの液性因子がDCのIL-12p70産生に及ぼす影響の評価. a. CD40L発現L細胞株とDCの共培養系に、CD3刺激したNKTサブセットの24時間後の培養上清を添加し、さらに各サイトカインに対する中和抗体を加えた際のDCにおけるIL-12p70産生. b. CD40L発現L細胞株とDCの共培養系に、各サイトカインを加えた際のDCにおけるIL-12p70産生. c. DCとCD4サブセットの共培養系に各サイトカインに対する中和抗体を加えた際のDCにおけるIL-12p70産生.

NKTサブセットはDCを介して自己反応性Th細胞の応答を抑制する

α -GalCerにより活性化を受けたDNおよびCD4サブセットと共培養したDCは、各doseのGAD65ペプチドに対して、T細胞クローンSA32.5およびMK20.2の増殖応答を抑制した(図8a). これらのクローンの増殖抑制は分裂が抑制されることに起因することが明らかとなった(図8b, c). 以上の観察は、DNおよびCD4サブセットが、その活性化を通してDCの寛容性分化を誘導することにより、自己反応性Th細胞の分裂・増殖を抑制することを示唆するものである。

考 察

最近、NKT細胞が認識する自己糖脂質抗原および微生物由来の糖脂質抗原が同定され、NKT細胞の有する生物活性が明らかになりつつある(Science 306: 1786-89, 2004. Nature 434: 520-5. 2005. Nature 434: 525-9. 2005.). これまでの研究の多くは、糖脂質抗原のアナログを用いることにより、NKT細胞の産生するサイトカインバランスを制御する方法に主眼が置かれてきた(Nature 413: 531-34. 2001. Arthritis Rheum. 50: 305. 2004.). これに対して本研究は、NKT細胞の応答性を制御するのではなく、機能的に異なるNKTサブセットを精製分離し、これをアジュバントとして応用することで免疫制御の中心的役割を果たすDCの機能を修飾し、これを免疫応答制御に応用しようとするものである。

本研究により、DNサブセットの活性化を通して成

熟したDCが、ナイーブTh細胞のTh2分化を優位に誘導し、CD4サブセットの活性化を通して成熟したDCは、IL-12p70を産生することでTh1分化を誘導することを明らかにした(日本免疫学会2005, 口頭発表). しかし、DCに対してIL-12産生を誘導するCD40L (CD154)分子の発現レベルは、NKTサブセット間で差異が認められないことから、CD40L以外の何らかの分子がIL-12産生に大きく貢献していることが予想される。

我々は以前の研究で、APC上のHLA-DRを抗体でクロスリンクすると、APCからのIL-12産生が促進されることを見出ししている(J. Immunol. 166: 2202-8. 2001.). CD1d分子はDCの細胞表面でHLAクラスII分子と近接して存在する為(EMBO J. 21: 1650-60, 2002.), CD1d拘束性に活性化されたCD4サブセットのCD4分子がオリゴマー形成することで、DCのHLAクラスII分子と安定な結合をし、これをクロスリンクする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6444-8. 1995. Immunol. Today 19: 455-61. 1998. Nat. Immunol. 3: 727-32. 2002.). これに伴ってDCにおけるHLAクラスII依存性のシグナルが積極的に誘導されることでIL-12産生が促進される。一方、CD4分子をもたないDNサブセットは、同様のシグナルが活性化しない為、IL-12産生が誘導されないことが予想される。すでにこの仮説の検証がスタートしているが、本研究によりCD4分子のオリゴマー形成がDCにおけるIL-12産生に重要な役割を果たすことが明らかになれば、CD4オリゴマー形成を抑制あるいは促進する為の新薬開発などの発展性を秘めている。

我々が解析に用いたDCは末梢血より分離した単

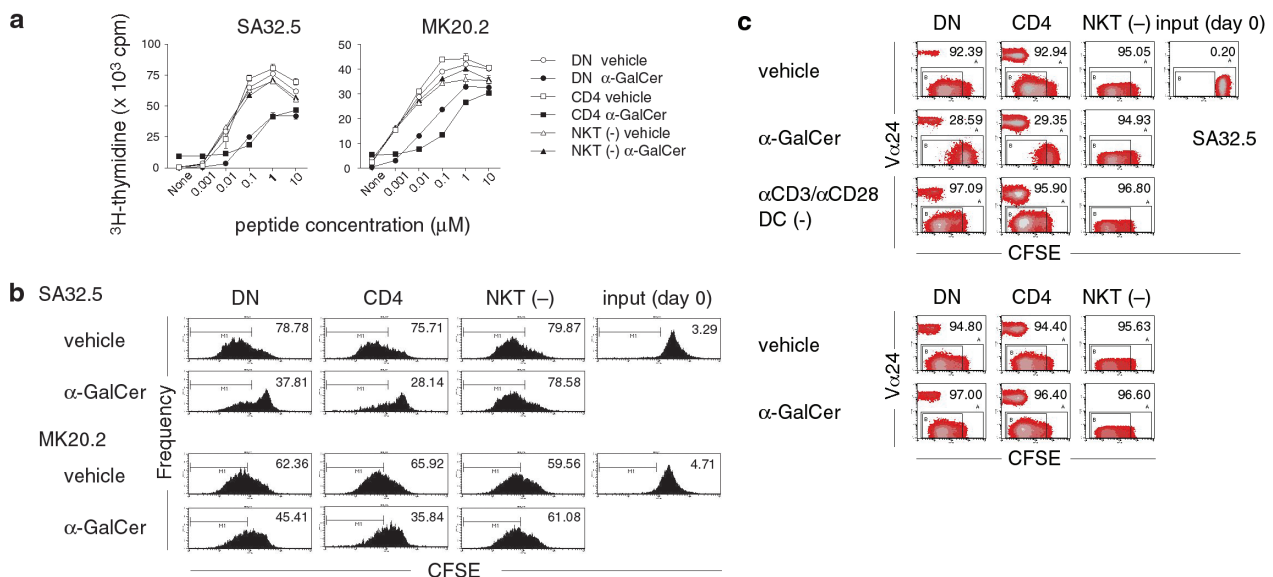


図8. NKTサブセットがDCを介して自己反応性Th応答に及ぼす影響の評価。a. DNおよびCD4サブセットと共培養したDCをAPCとし、これに1型糖尿病の自己抗原として知られるGAD65ペプチドを添加し、これと共培養したGAD65自己反応性T細胞クローンの増殖応答性。これらのクローンは、異なる1型糖尿病患者より樹立され、HLA-DR53拘束性にGAD65ペプチドを認識する。b. CFSEでこれらのThクローンを標識して4日後の分裂の程度を示す。

球から *in vitro* で誘導することが可能であり, 自己の NKT サブセットと DC を生体外で作用させ, 機能的修飾を付与した DC を生体内に移入することで, リスクのない免疫制御効果が期待できる. したがってヒトを対象とした実用性の高い免疫制御療法の可能性を秘め

ている. 本研究の成果は, 自己免疫疾患のみではなく, アレルギー性疾患, 感染症, 癌, あるいは移植医療における拒絶反応の制御など, 多方面への応用が期待される.